

CAPITULO II

PROSPECCIÓN DE VIRUS ASOCIADOS A AMARILLEO EN MELÓN EN LA PROVINCIA DE LLEIDA *

* Este trabajo ha sido parcialmente presentado como comunicación oral en el IV Congreso Nacional de Ciencias Hortícolas (Cáceres, 2001) y forma parte de la publicación: Virus asociados al amarilleo del melón. Rodrigo, G., Achón, M. A., Juárez, M., Medina, V. 2002. Actas de Horticultura (aceptado)

1. INTRODUCCIÓN

A pesar del extenso trabajo que se ha realizado en la prospección de virus de cucurbitáceas a escala nacional, sobre la provincia de Lleida no existe información. En esta provincia la superficie media dedicada a los cultivos de melón al aire libre es cercana a las 260 ha, siendo la comarca de El Segrià la principal zona de producción (DARP, 1999). En los últimos años, en esta zona se ha venido observando un síndrome similar al descrito como ‘amarilleo de las cucurbitáceas’, y presencia de moscas blancas, especulándose con la posible presencia de BPYV o CYSDV.

Aranzana (1997), en un trabajo previo realizado en el área de Virología Vegetal del Depto. PVCF de la UdL, realizó prospecciones dirigidas a plantas con síntomas de amarilleo y otros síntomas atribuibles a virus, durante todo el ciclo del cultivo en la comarca de El Segrià, para determinar su posible relación con BPYV y CYSDV. Los resultados de las pruebas serológicas postularon la posible presencia de BPYV en la zona. Además de estos virus, y también mediante serología, se analizó la posible presencia de CaBYV, CMV, PRSV-W, SqMV, WMV-2 y ZYMV.

La presencia e incidencia relativa de CMV, PRSV-W, WMV-2 y ZYMV en los cultivos de melón al aire libre nacionales ha sido evaluada por Luis-Arteaga *et al.* (1998). Estos autores, en las prospecciones dirigidas a plantas con síntomas atribuibles a virus, comprobaron que entre las diversas áreas de producción existen diferencias y variaciones temporales en la distribución e incidencia relativa de estos virus.

En el Sultanato de Omán, Zouba *et al.* (1998) han determinado la presencia de un virus transmitido de forma no persistente por *B. tabaci* que produce amarilleo internervial en las hojas de los cultivos de melón al aire libre, al que han denominado virus del rizado amarillo de la hoja de la calabaza (*Squash yellow leaf curl virus*) (Gén. *Ipomovirus*), y que presenta una reacción serológica cruzada con WMV-2, pero no con PRSV-W ni con ZYMV.

Todos estos hechos, han planteado la continuación del estudio de Aranzana durante la realización de esta Tesis Doctoral, con el fin de confirmar la asociación o no del amarilleo observado en melón con agentes virales, y concretamente con BPYV, y

estudiar los virus de hortalizas que afectan al melón en la provincia de Lleida. Para ello, se ha realizado una prospección en los cultivos de melón al aire libre de la comarca de El Segrià durante dos años consecutivos y en diferentes estados fenológicos del cultivo. Aunque el estudio se ha dirigido a plantas con amarilleo generalizado, en las primeras fases del cultivo también se han estudiado amarillos localizados (mosaicos), por su posible relación inicial con el desarrollo de los síntomas descritos a medida que progresa la infección.

2. OBJETIVOS

- Establecer la relación entre el amarilleo observado en melonares de la provincia de Lleida y la infección por virus
- Determinar la presencia de virus transmitidos por moscas blancas en la zona de Lleida.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Prospecciones

Durante los años 1998 y 1999, en la zona de Lleida (Figs. 14 y 15) se realizaron prospecciones dirigidas a plantas con síntomas de amarilleo y otros síntomas atribuibles a virus, en parcelas comerciales de melón al aire libre en regadío, en las que previamente tanto los agricultores como los técnicos de las Asociaciones de Defensa Vegetal habían observado y confirmado la presencia de poblaciones de *T. vaporariorum* y de *B. tabaci*.

El muestreo se realizó en 13 parcelas (la referencia catastral de cada una de estas parcelas, atendiendo al año en que se realizó el muestreo, el término municipal al que pertenecen y el número asignado en el muestreo (Figs. 14 y 15), se recoge en el Anejo VI). El primer año, el muestreo se realizó en un total de siete parcelas equivalentes a una superficie aproximada de 11 ha, recogiendo muestras semanalmente desde el transplante hasta el final de la recolección. En el segundo año, el muestreo se realizó en seis parcelas, equivalentes también a una superficie de 11 ha, y durante recolección. Las hojas recogidas, previa descripción de los síntomas

y posterior liofilización, se preservaron a -20°C en presencia de CaCl_2 hasta su análisis.

3.2. Métodos serológicos

3.2.1. Antisueros, purificación de inmunoglobulinas y prueba ELISA

Se dispuso de antisueros policlonales contra BYV (proporcionados por el Dr. Valerian Dolja⁶), BWYV, CaBYV, CMV, PRSV-W, SqMV, WMV-2 y ZYMV (proporcionados por el Dr. Bryce W. Falk). Así mismo se dispuso de material vegetal sano e infectado con estos virus como controles positivos y negativos. En el caso de CMV, WMV-2 y ZYMV fueron proporcionados por la Dra. Asumpció Batlle⁷ y CaBYV por el Dr. Bryce W. Falk. Para BYV, BWYV, PRSV-W y SqMV se emplearon controles comerciales (Sanofi, Durviz S.L.).

La purificación de las IgG de los antisueros arriba mencionados se llevó a cabo como describen Clark y Bar-Joseph (1984) y ya se ha especificado en el apartado 3.2.1.2. del capítulo I.

Para determinar las concentraciones óptimas de uso de estas IgG específicas y de las conjugadas con fosfatasa alcalina, se realizaron ensayos de condiciones mediante técnica ELISA en su modalidad ACP, tal y como se ha descrito en el apartado 3.2.1.3. del capítulo I. El material vegetal se homogeneizó en tampón carbonato en la proporción 1:100 (p/v). La concentración de uso de las IgG específicas de cada antisuero y de las conjugadas se muestra en el cuadro 6.

3.3. Reacciones de transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa para el diagnóstico de *Beet pseudo-yellows virus* y *Cucurbit yellow stunting disorder virus*

La presencia de BPYV y de CYSDV en las muestras con síntomas de amarilleo se determinó mediante RT-PCR (ver apartado 3.2.2.3, capítulo I) empleando 5 μl de ARNs totales extraídos a partir de 0,02 g de tejido liofilizado con el kit comercial

⁶ Dept. of Botany and Plant Pathology. Oregon State University. EUA

⁷ Depto. de Patología Vegetal (IRTA-Cabrils)

RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) y el kit GeneAmp[®] ThermoStable *rTth* Reverse Transcriptase RNA PCR kit (Perkin Elmer, Applied Biosystems S.A.).

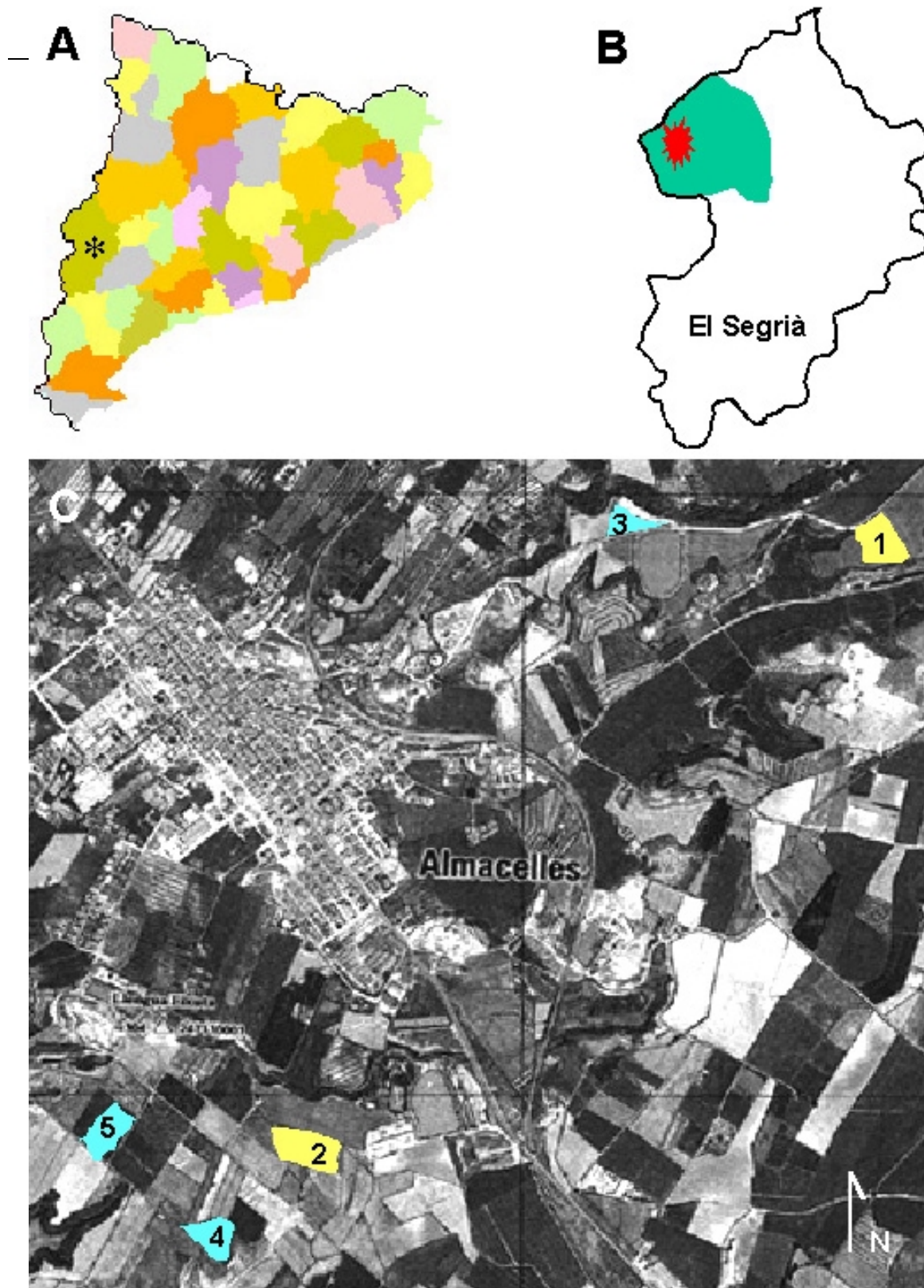


Figura 14. Localización de la zona de muestreo en la provincia de Lleida. A, plano comarcal de Catalunya. B, principal área de producción de hortalizas (verde) de la comarca de El Segrià. C, ortofotomapa (nº 358-2-2) en el que aparecen las parcelas del término municipal de Almacelles en las que se realizó el muestreo en 1998 (amarillo) y en 1999 (azul) (escala de esta imagen 1:25000).



Figura 15. Ortofotomapas (nº 387-2-1 y 358-2-2) de los términos municipales de Gimenells (A) y de Sucs y el Pla de la Font (B) de la provincia de Lleida, donde se indican las parcelas en las que se realizó el muestreo en 1998 (amarillo) y en 1999 (azul) (escala 1:25000).

Cuadro 6. Concentración de uso de las inmunoglobulinas de cada antisuero y de las inmunoglobulinas conjugadas con fosfatasa alcalina

VIRUS ¹	ANTISUERO Concentración IgG ²	
	IgG (µg/ml)	IgG Conjugadas (v/v)
BYV	1	1:7500
BWYV	1	1:7500
CaYBV	1	1:7500
CMV	1	1:7500
PRSV-W	1	1:7500
SqMV	0,5	1:7500
WMV-2	1	1:7500
ZYMV	1	1:15000

¹ BYV: *Beet yellows virus*; BWYV: *Beet western yellows virus*; CaBYV: *Cucurbit aphid-borne yellows virus*; CMV: *Cucumber mosaic virus*; PRSV-W: *Papaya ring-spot virus watermelon strain*; SqMV: *Squash mosaic virus*; WMV-2: *Watermelon mosaic virus-2*; ZYMV: *Zucchini yellows mosaic virus*.

² IgG: inmunoglobulinas

4. RESULTADOS

4.1. Síntomas observados

En los dos años de estudio, los síntomas observados fueron, principalmente, mosaicos, deformaciones generalizadas en las hojas, tanto en el borde como en el limbo, aclaramiento de venas y en algunos casos enanismo y clorosis internerviales y amarilleo en las hojas más adultas (Fig. 16). En el año 1998 se recogieron 194 muestras, de las que el 44% presentaban clorosis internerviales y amarilleo en las hojas más adultas, observándose un aumento de los síntomas de amarilleo durante el período de recolección. En el año 1999, recogieron 92 muestras, de las que 46% mostraban estos síntomas (cuadro 7).

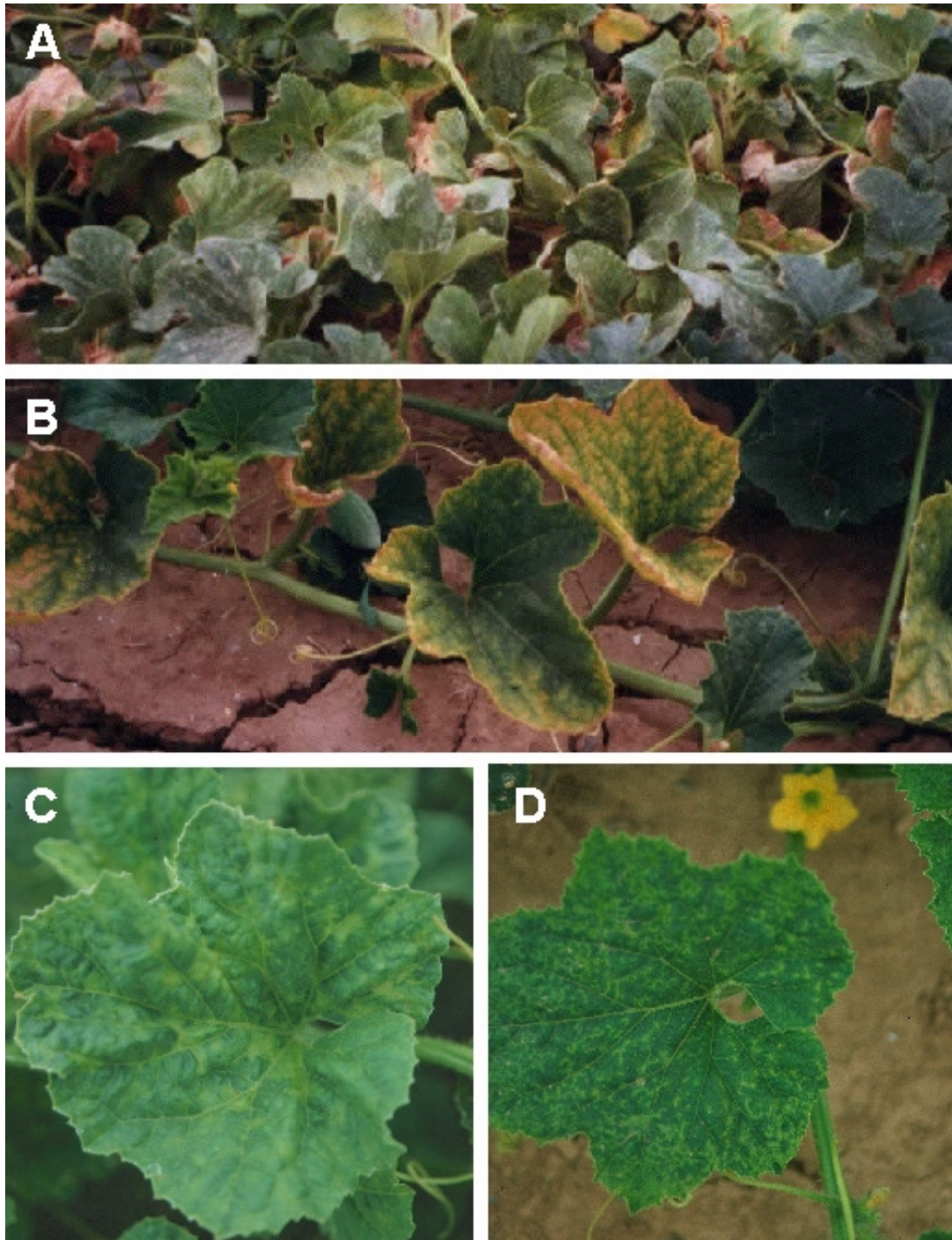


Figura 16. Síntomas observados en las muestras de melón de la comarca de El Segrià. A: plantas con amarilleo. B: hojas viejas con clorosis internerviales y necrosis en el borde del limbo. C: hiperplasia en hoja. D: mosaico.

4.2. Presencia de *Beet yellows virus*, *Beet western yellows virus*, *Cucurbit aphid-borne yellows virus*, *Cucumber mosaic virus*, *Papaya ring-spot virus watermelon strain*, *Squash mosaic virus*, *Watermelon mosaic virus-2* y *Zucchini yellows mosaic virus*

Mediante prueba ELISA, únicamente, se han detectado infecciones producidas por virus transmitidos por pulgones (cuadro 7). En los dos años de estudio CMV fue el virus más abundante, detectándose en el 71% de las muestras analizadas. También se detectó la presencia de WMV-2 y ZYMV, aunque en un porcentaje inferior de muestras (19% en ambos casos).

CMV se observó tanto en infecciones simples como en distintos tipos de infecciones múltiples con los dos *Potyvirus* (cuadro 8). Además, WMV-2 y ZYMV también se detectaron formando infecciones dobles. En ninguna de las muestras se detectó la presencia de BYV, BWYV, CaBYV y PRSV-W. En 1999, se observó una reducción en el número de muestras infectadas con estos tres virus. CMV se detectó en el 38% de las muestras frente al 85,6% del año anterior, WMV-2 en el 6,5% frente al 25,5% de 1998 y ZYMV en el 7,6% frente al 24,7%.

Cuadro 7. Resultados de los análisis serológicos mediante ELISA-ACP durante los dos años de estudio

Año	Total de muestras ²	Número de muestras infectadas ¹							
		BYV	BWYV	CaBYV	CMV	PRSV-W	SqMV	WMV-2	ZYMV
1998	A 85	0	0	0	72	0	0	21	21
	M 109	0	0	0	96	0	0	28	27
	Total 194	0	0	0	168	0	0	49	48
1999	A 43	0	0	0	11	0	0	2	2
	M 49	0	0	0	24	0	0	4	5
	Total 92	0	0	0	35	0	0	6	7

¹BYV: *Beet yellows virus*; BWYV: *Beet western yellows virus*; CaBYV: *Cucurbit aphid-borne yellows virus*; CMV: *Cucumber mosaic virus*; PRSV-W: *Papaya ring-spot virus watermelon strain*; SqMV: *Squash mosaic virus*; WMV-2: *Watermelon mosaic virus-2*; ZYMV: *Zucchini yellows mosaic virus*.

²A: amarilleo; M: mosaico

Cuadro 8. Tipos de infecciones detectadas durante los dos años de estudio

Año	Nº total muestras analizadas	Número de muestras infectadas					
		Simple	Múltiples				
		CMV	CMV y WMV-2	CMV y ZYMV	WMV-2 y ZYMV	CMV, WMV-2 y ZYMV	
1998							
	Amarilleo	85	54	1	0	3	18
	Mosaico	109	75	0	0	7	20
	Total	194	129	1	0	10	38
1999							
	Amarilleo	43	9	0	0	0	2
	Mosaico	49	20	0	1	1	3
	Total	92	29	0	1	1	5

CMV: *Cucumber mosaic virus*; WMV-2: *Watermelon mosaic virus-2*; ZYMV: *Zucchini yellows mosaic virus*.

4.3. Presencia de *Beet pseudo-yellows virus* y *Cucurbit yellow stunting disorder virus*

No se detectó la presencia de ninguno de los *Closteroviridae* ensayados en las muestras analizadas.

5. DISCUSIÓN

CMV fue el virus más abundante seguido por WMV-2 y ZYMV. Durante el desarrollo del estudio se observó que el número de plantas con síntomas atribuibles a virus era más alto en las fases tardías del cultivo, pero en cambio se observó una disminución en el número de muestras infectadas con estos virus. Luis-Arteaga *et al.* (1998) postulan que las variaciones observadas a lo largo de la época de cultivo se pueden atribuir a modificaciones en el comienzo de las epidemias. Entre los dos años de estudio, a pesar de que la tendencia de las infecciones detectadas se mantiene, en 1999 se observa un descenso en el número de muestras infectadas con CMV, WMV-2 y ZYMV. Estas variaciones temporales en la distribución e incidencia relativa, aunque

podieron estar influenciadas por los diferentes tipos de prospección realizadas, también han sido descritas por Nameth *et al.* (1986), Ullman *et al.* (1991), Grafton-Cardwell *et al.* (1996), Luis-Arteaga *et al.* (1998) y Yuki *et al.* (2000) en otras áreas de producción, indicando que la presencia, distribución e incidencia de estos virus en cultivo al aire libre cambia de año en año y de aquí la dificultad de establecer estrategias de control efectivas.

En este estudio, y al igual que en el de Luis-Arteaga *et al.* (1998), el virus más abundante es CMV, que se detecta mayoritariamente en infecciones simples. Este virus también aparece formando distintas infecciones múltiples, pero, al contrario que en el estudio de Luis-Arteaga *et al.* (1998), las infecciones triples por CMV, WMV-2 y ZYMV, han predominado sobre las dobles, CMV y WMV-2, CMV y ZYMV, WMV-2 y ZYMV. Este mayor número de infecciones triples también fue observado por Aranzana (1997). Estas diferencias en los tipos de infecciones, así como en la presencia e incidencia relativa de las mismas, observadas tanto entre la zona de Lleida como entre las diferentes zonas de producción nacionales podrían atribuirse a factores ecológicos, tales como la presencia y abundancia de reservorios virales, la composición y dinámica de las poblaciones de vectores, y las prácticas culturales propias de cada zona (Luis-Arteaga *et al.*, 1998).

La presencia de ZYMV se asocia, en la mayoría de los casos, a la de WMV-2, hecho que podría ser atribuible a la utilización de ELISA indirecto (Converse y Martin, 1990) pero, el que no se detecten relaciones serológicas cruzadas en los testigos positivos de estos potyvirus descarta tal posibilidad. En 1985, Lecoq *et al.* ya postularon que dicha asociación podría deberse a la transmisión conjunta de estos virus por pulgones, circunstancia que Yuki *et al.* (2000) han comprobado al observar que la infección por WMV-2 facilita y contribuye a la transmisión de ZYMV.

La no detección de infecciones por PRSV-W puede deberse a la baja incidencia que este virus presenta en las áreas de cultivo nacionales, así como a su limitación geográfica (Luis-Arteaga *et al.*, 1998). Tampoco se han detectado infecciones producidas por SqMV, si bien en este caso es necesario comentar que las infecciones por SqMV detectadas por Aranzana (1997) se debieron a un lote de semillas que había superado los controles de certificación pero que estaban infectadas con este

virus, como posteriormente confirmó El Servei de Protecció dels Vegetals del DARP (M^a José Aranzana, c. personal).

En las muestras recogidas con síntomas de mosaico (55% muestras totales) se han detectado infecciones producidas por virus transmitidos por pulgones en el 81% de ellas, no detectándose infecciones producidas por los virus causantes del amarilleo de las cucurbitáceas BPYV, BYV, BWYV, CaBYV o CYSDV. En las muestras con amarilleo, que tampoco están infectadas con los virus anteriores, esta sintomatología únicamente se puede asociar directamente a las infecciones triples producidas por CMV, WMV-2 y ZYMV (Esteve y Nuez, 1991; Luis-Arteaga, 1991) y, aunque, WMV-2 presenta una reacción cruzada con un *Ipomovirus* inductor de amarilleo en cucurbitáceas (Zouba *et al.*, 1998), los análisis realizados no han sido suficientes para determinar su posible presencia. El establecimiento de la relación entre los síntomas de amarilleo y la presencia de infecciones virales en las muestras con amarilleo recogidas en 1999 presenta dificultades, ya que únicamente el 25% de las muestras estaban infectadas con los virus determinados, y dado que estas muestras se recogieron en la etapa final del cultivo, parece probable que estén reflejando distintos problemas fisiológicos o procesos de senescencia derivados de la edad de las plantas, aunque no se descarta la presencia de algún otro fitopatógeno.

Los resultados del estudio muestran que los cultivos de melón al aire libre en la zona de Lleida están dentro de la tendencia descrita por Luis-Arteaga *et al.*, (1998) y se ven infectados principalmente por virus productores de mosaico y transmitidos por pulgones. Hasta el momento, y aunque existen poblaciones de moscas blancas, en la zona no se detecta la presencia de virus transmitidos por estos vectores.

